

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

B01L 3/02

B01J 4/02 G01F 11/00

G01N 27/447 B01L 3/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01807861.3

[43] 公开日 2003年6月4日

[11] 公开号 CN 1422185A

[22] 申请日 2001.4.6 [21] 申请号 01807861.3

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 10 [33] DE [31] 10017791.3

[86] 国际申请 PCT/EP01/04000 2001. 4. 6

[87] 国际公布 WO01/76745 德 2001. 10. 18

[85] 进入国家阶段日期 2002. 10. 10

[71] 申请人 巴斯福股份公司

地址 德国路德维希港

共同申请人 德国癌症研究中心

[72] 发明人 H·艾佩尔 M·拜尔

S·马蒂西克

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

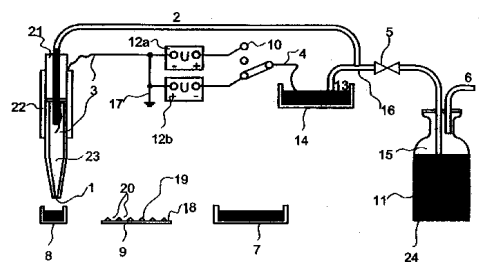
代理人 于静 黄革生

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用于生物聚合物阵列的极少量液体的微测方法和设备

[57] 摘要

本发明涉及用于产生生物聚合物阵列的极少量液体的微测方法和设备。待分析的样品液借助于一种提供装置(1, 23)提供, 该装置能够连接到清洗液(24)原液。能够向提供装置(1, 23)施加可逆电压(10), 使得引起的电渗流能够用于向检测场(18)传送样品液。



ISSN 1008-4274

1. 一种用于产生生物聚合物阵列的极少量液体的微测方法，其中待分析样品可通过提供装置(1, 23)提供，该装置能够连接到清洗液(24)，其中能够在提供装置(1, 23)与缓冲容器(14)之间施加可逆电压，使得引起的电渗流能够用于向检测表面(18)传送样品液。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中从容器(8)吸取生物聚合物，并在电压反向后，通过向提供装置(1, 23)的驱动毛细管(2)施加一电压实现待测量的生物聚合物液体的释放。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中毛细管空间(23)的移液管尖端(1)能够以三个方向移动。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中引起样品液从毛细管空间(23)流出的电压的反向是在移液管尖端(1)已经达到检测表面(18)的位置之后实现的。

5. 如上述一个或多个权利要求中所述的方法，其中能够借助于阀门(5)对驱动毛细管(2)与移液管尖端(1)提供缓冲液，该溶液储存在压力容器中，并具有适合于产生电渗压力的 pH 和适当的离子浓度。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中带电荷生物聚合物样本在标本载片(9)上的电泳沉积是通过标本载片表面(18)上的导电层实现的。

7. 用于产生生物聚合物阵列的极少量液体的微测的设备，其中待分析的样品基质能够借助于一种提供装置(1, 23)提供，该装置能够连接到清洗液(24)，其中通过电触头(4)连接到缓冲液容器(14)中的内含物的电压反向开关元件(10)，集成到用于向驱动毛细管(2)施加电压的供电线路(3)中。

8. 如权利要求 7 中所述的设备，其中流阻(13)结合到驱动毛细管(2)的分支(16)中，以保证驱动毛细管(2)的连续供料，并用于以缓冲液(24)清洗。

9. 如权利要求 8 中所述的设备，其中装有实现移液管尖端(1)朝向标本载片(9)定位的 X/Y 定位装置，用于移液管尖端(1)相对于检测场(18)的定位。

10. 如权利要求 8 中所述的设备, 其中驱动毛细管(2)由玻璃或石英构成。

11. 如权利要求 8 中所述的设备, 其中移液管尖端(1)由玻璃毛细管制而成, 其尖端被拉制成小直径, 该尖端直径范围从 $10\ \mu\text{m}$ 到 $1000\ \mu\text{m}$ 。

12. 如权利要求 11 中所述的设备, 其中移液管尖端(1)由玻璃毛细管制而成, 其尖端被拉制成小直径, 该直径范围从 $50\ \mu\text{m}$ 到 $300\ \mu\text{m}$ 。

13. 如权利要求 8 中所述的设备, 其中在移液管尖端(1)与驱动毛细管(2)之间装设电接地。

14. 如权利要求 8 中所述的设备, 其中在移液管尖端(1)与驱动毛细管(2)之间提供连接, 以便产生电渗流, 其中铂导线电极(3)在毛细管头部(21), 且驱动毛细管(2)末端处的另一电触头(4)浸入装有电触头的缓冲容器(14)。

用于生物聚合物阵列的极小量液体的微测方法和设备

本发明涉及用于生物聚合物阵列或生物聚合物场的极小量液体的微测方法和设备。

对于诸如核酸、蛋白质或多糖等生物聚合物的高度并行分析，使用微聚合物场，也称为微阵列。对于此类场或阵列的生产，溶解或悬浮在皮升到纳升范围的液体中非常少的生物聚合物样品必须按规则排布施涂到基片表面，例如施涂到标本载片上。常规的移液管法对这样小量的液体是无能为力的。

由于迄今对要转移的量进行精确计量仍然是极为困难的，故通常不进行精确计量，而是借助于涉及类似于笔的机械接触设备对液量进行转移。然而所采用这种笔只有有限的液体保持量，因而不能以一个笔的填充对多个基片载体表面加载。为了增加所用笔的容量，已试图对笔提供凹口或槽口，以便使笔容纳欲加载的较大量的样品基质。虽然这样确实能够使笔的容量增加，以至用单个的笔填充使较大数目的生物聚合物点能够施涂到标本载片上，但这种装有槽口和狭槽设计的笔的清洗是很困难的。当新的生物样品要借助于笔施涂到被加载的标本载片时，必须很小心地从扩大笔容量的槽口和狭槽去除来自以前样品加载操作的残余物。

借助于这种生物聚合物阵列进行分析时，为了使测量误差尽可能小，通常使用内部标准。

从先有技术已知的解决方案及这些方案固有的缺陷来看，本发明的目的是要以一种简单而可靠的方式用极小量的液体加载生物聚合物阵列。

已经发现，该目的可根据本发明通过对用于产生生物聚合物阵列的极小量液体的微测方法实现，其中待分析的样品液可借助于一种提供装置提供，该装置能够连接到冲洗液并可向其施加可逆电压，使得产生的电渗流

能够用于向检测表面传送样品液。

使用根据本发明提出的方法能够实现的优点主要是，可施加至容纳样品基质的毛细管移液管尖端的电压使得在移液管尖端已经处于各标本载片检测区的位置时，能够对极小量液体进行非常精确的测量。如果通过施加产生样品液传送的电压来使用彼此并行操作的多个毛细管移液管尖端，则各个生物聚合物点能够以精确的方式低费用而快速排布在标本载片的检测表面上，实现高度精确的彼此分离。

根据本发明提出的方法的进一步的实施例中，向驱动毛细管和提供装置施加电压引起生物聚合物被吸出样品原液，并在电压反向之后，待测量的液体被分配。于是，在检测场表面上样品液量的分配和生物聚合物点的产生不再需要在毛细管腔体内被机械驱动的部件。

根据按本发明提出的方法的更为先进的实施例，用于传送样品基质的电压施加在毛细管头部与驱动毛细管的毛细管空间之间。这使得供电线路馈送到玻璃毛细管的上部，即在与移液管尖端相反的玻璃毛细管末端。

根据按本发明的解决方法又一先进的方面，毛细管空间的移液管尖端能够以三个方向移动。移液管尖端除了在检测场上 X 和 Y 方向的可移动性之外，在实现液体喷射的电压施加到毛细管腔体的内含物之前，移液管还能够朝向检测场表面的 Z 方向移动。

为了避免在向检测表面施加生物聚合物模式中样品液的损失和差错，当移液管尖端位于检测表面时进行电压反向，实现样品基质从毛细管的毛细管空间喷射。

最后，在根据本发明提出的用于极小量液体测量的方法中提出，驱动毛细管与其移液管尖端借助于一阀门连接到储存在增压容器内的缓冲液，其中用来产生电渗透压力的缓冲液是有对应的的 pH 值和离子浓度的优选缓冲液。

最后，通过施加到标本载片表面上的导电层，即向检测表面，提出对标本载片上的带电荷生物聚合物样本进行电泳沉积。使用根据本发明提出的方法的这种变型，即使在施加和生产生物聚合物阵列期间也能够进行后

继的分析操作步骤。

根据按本发明进一步提出的用于极少量液体微测的设备，使电压反向并通过电接触与缓冲容器的内含物连接的切换元件被集成到用于向驱动毛细管施加电压的供电线路中。借助于根据本发明所提出的设备，通过移液管尖端在标本载片的检测场之上降低的状态，通过简单的电压反向能够使极少量液体由于样品基质中的电渗流作用而被施加。

为了保证对驱动毛细管连续提供缓冲液，在位于阀门之后的驱动毛细管的一个分支中结合有缓冲液容器之上的流阻。通过适当尺度的流阻，能够实现驱动毛细管无气泡和无空腔提供缓冲流体。

在一种有利的方式中，一个驱动毛细管的移液管尖端或多个驱动毛细管的移液管尖端，能够借助于简单设计的 X/Y 定位单元在检测场上方移动，并于是能够设置生物聚合物点施加到检测表面的正确位置。移液管尖端除了在 X 和 Y 方向的可移动性之外，定位单元 - 例如市售的绘图仪 - 也能够实现移液管尖端在朝向检测场表面的 Z 方向的定位。

驱动毛细管和移液管尖端最好由玻璃或石英制成。

最好将微毛细管的移液管尖端拉制成尖端直径在 $10\ \mu\text{m}$ 到 $1000\ \mu\text{m}$ 范围的小直径拉制的尖端。移液管尖端的直径尤其优选地在 $50\ \mu\text{m}$ 到 $300\ \mu\text{m}$ 范围。

为了保证接地，在移液管尖端和驱动毛细管之间设有电接地。

最后，使用适配在驱动毛细管的毛细管头部中的铂导线电极，在移液管尖端与驱动毛细管之间装有用于电渗流产生的连接，驱动毛细管末端另一电连接浸入在装有电触头的缓冲容器中。这样驱动毛细管处的电压电路仅由电极反向开关中断，并从而能够以对应于向检测表面加载生物聚合物点所需的频率的频率断开或闭合。

以下将参照附图更为详细地说明本发明。

单个的一个附图示出根据本发明提出的用于施加皮升到纳升范围的极少量液体的设备结构的示意图。

用来向标本载片 9 的检测表面 18 施加样品液的移液管尖端 1 是一种玻

璃毛细管，该毛细管可非常廉价生产，具有拉制成例如 $200\ \mu\text{m}$ 直径的尖端。如通常在气相色谱分析中那样，这一毛细管在其末端通过一微型软管连接到玻璃或石英的驱动毛细管 2。用于产生电接触的铂导线电极 3 插入到微型软管的管连接中。在驱动毛细管 2 的相反一端是第二电触点 4，该触点伸到盛放在缓冲容器 14 中的缓冲液内含物中。盛放在缓冲容器 14 中的流体通过管线分支 16 连续地被提供，其中配有流阻 13，使得电触点 4 总是与驱动毛细管 2 中的流体接触。

在移液管操作的开始，使用 X/Y 定位装置，例如市售的绘图仪形式或其它 X/Y 定位装置，玻璃毛细管的移液管尖端 1 首先被移动到废料容器 7 上方。配置在驱动毛细管 2 上游的阀门 5 接下来短时打开，并使得驱动毛细管 2 与位于废料容器 7 上方的移液管尖端 1 连续地充以新鲜的缓冲液，其 pH 值和离子浓度被设置为适当的值，以便从加压储存容器 11 通过气体连通 6 在驱动毛细管 2 中产生电渗流，并这样移液管尖端 1 同时在废料容器 7 上方被吹出。位于所述分支 16 中例如玻璃料形式的流阻 13，引起小量的缓冲流体被迫进入缓冲容器 14 内，使得保证了通到移液管尖端的驱动毛细管 2 总处于充有连续提供的缓冲原液。

这里示意示出的开关元件 10 装配在供电线路 3 与通向缓冲容器 14 的电触点 4 之间。由标号 12a 和 12b 标记的两个电压源连接到开关元件 10 的开关触点，并通过接地线 17 接地。

为了排出由生物聚合物容器 8 提供的被吸移的生物聚合物溶液，通过开关 10 向两个电连接点 3 和 4 施加适当方向的电压，以便在驱动毛细管 2 中向后的方向产生电渗流。在一这时间点，在 Z 方向看移液管尖端 1 浸入样品容器 8，使得样品基质根据所施加的电压通过移液管尖端 1 的开口被向上吸。当已经从生物聚合物容器 8 排出足够的吸移材料时，这里例如微滴定板的孔，自动微吸移系统，即 X/Y 定位装置使吸移尖端 1 定位在被加载的基片上方。例如，基片可以是显微镜中常用的标本载片 9。从移液管尖端 1 排出的各个生物聚合物小滴施加到标本载片表面 18，该载片表面装设在标本载片 9 上。检测表面 18 还可以是与生物聚合物化学结合的面或与

之有物理-化学反应的表面。向标本载片 9 施加生物聚合物点是借助于 X/Y 提供装置进行的,该装置还便于使移液管尖端 1 在检测场 18 的方向下降。为此,通过开关 10 就可选择的时间向驱动毛细管 2 施加反向电压,其结果是,通过这时在反向运行的电渗流迫使被吸移的液体从移液管尖端 1 流出,并流出到标本载片 9 的检测表面 18。从而样品液被释放到检测表面 18 或释放到另一容器中。作为替代两个电压源的使用方式,也可以使用带有对应的切换元件的单个的电压源,以及其它例如接地的变型也完全是可能的。

虽然适当调节参数会影响电渗流,诸如主要是缓冲液的离子浓度和 pH 及施加的电压,但在标本载片的检测表面 18 上产生各生物聚合物点期间分配的液量能够近似保持不变。这使得包含在 X 和 Y 方向都按规则彼此分隔 20 排布的生物聚合物点的模式 19,能够在标本载片 9 的检测表面 18 上产生。

为了加速并为了电化学活化生物聚合物点结合到与该生物聚合物有化学或物理-化学相互作用的标本载片 9 的适当表面 18 上,在移液管尖端 1 接触之后,在移液管尖端 1 的连接端 3 与标本载片 9 的导电面之间可另外施加适当极性的电压。这使得即使标本载片在施加它们短时间之后也能够进行带电生物聚合物样本的电泳沉积,这对于进一步分析和样品的评价是非常有利的。

在图 1 中可看出,驱动毛细管 2 的头部适配在毛细管头部 21 中,后者本身由安装件 22 例如一小段软管围绕。玻璃或石英移液管尖端 1 以适当的方式被容纳在安装件 22 中,移液管尖端 1 有腔体 23,被吸移的样品液被吸入该腔体,或者电渗流的反向从腔体 23 喷出。优选地由玻璃制成的移液管尖端 1 可具有范围在 $10\ \mu\text{m}$ 到 $1000\ \mu\text{m}$ 的一开口,优选地在移液管尖端开口 1 处形成直径为 $50\ \mu\text{m}$ 到 $300\ \mu\text{m}$ 。

标号表

1 移液管尖端

-
- 2 驱动毛细管
 - 3 电触头
 - 4 电连接
 - 5 阀门
 - 6 气体连通
 - 7 废料容器
 - 8 生物聚合物容器
 - 9 标本载片
 - 10 极性反向开关
 - 11 原液瓶
 - 12a 电压源 +
 - 12b 电压源 -
 - 13 流阻
 - 14 缓冲容器
 - 15 压力管线
 - 16 T-形件
 - 17 接地
 - 18 标本载片表面
 - 19 生物聚合物图形
 - 20 生物聚合物点的间隔
 - 21 毛细管头部
 - 22 安装件
 - 23 毛细管腔体
 - 24 缓冲液

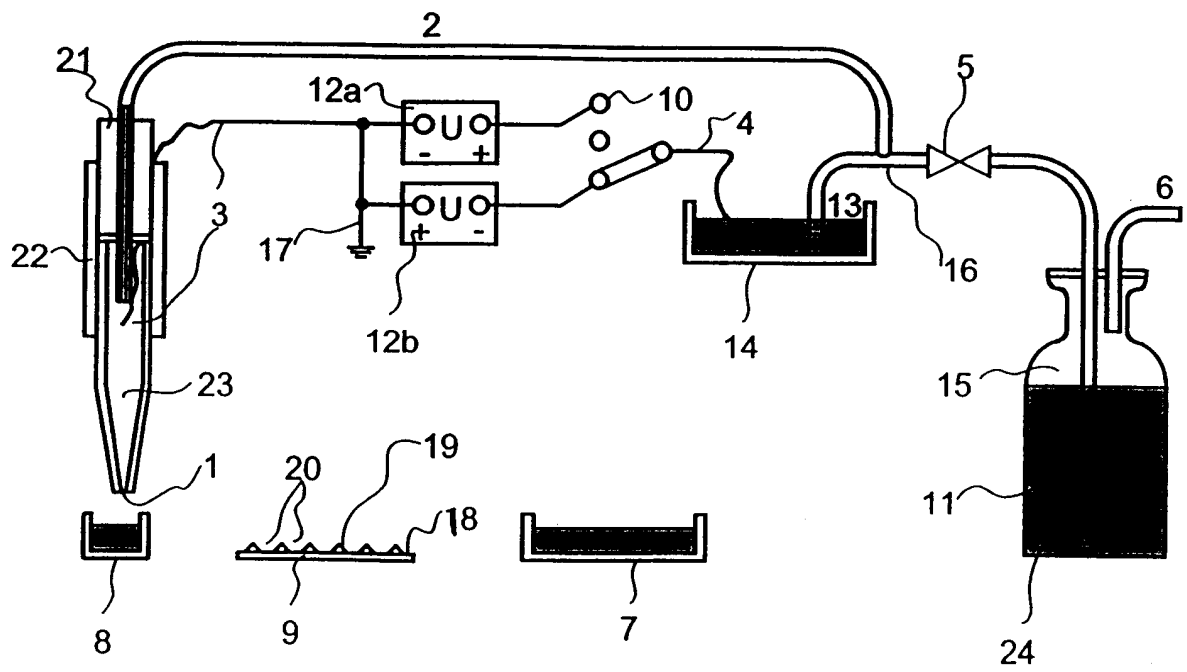


图 1